

山西梨属植物资源的 SSR 遗传多样性分析

曲永青, 王 然, 马春晖, 李鼎立, 宋健坤

(青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

摘 要:以 50 份野生梨属植物资源为试材,应用 SSR 分子标记技术对其进行了遗传多样性分析,以探索山西省梨属植物资源的遗传多样性。结果表明:筛选的 40 对 SSR 引物扩增得到 236 个等位基因位点,平均每对引物扩增得到 5.90 个等位点。不同样品间遗传多样性指数为 0.276 2~0.431 9,检测位点杂合度为 0.335 0~0.775 0,多态信息含量变化范围在 0.236 8~0.431 2,表明 4 个遗传多样性参数均表现出较高的遗传多样性。聚类分析结果显示,50 份样品相似系数的变化范围在 0.444 9~0.944 9,样品在相似系数 0.57 处被分为四大类群,类群 I 为豆梨类,类群 II、III、IV 为杜梨类;其中,类群 II、III 集中了大部分白家山和绛县地区的样品,类群 IV 的样品全部来自太谷,表明山西梨属植物资源的聚类结果与样品的地理分布基本吻合;发现大果、绿皮杜梨野生资源。

关键词:梨;野生资源;SSR;遗传多样性

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0011-07

梨属 (*Pyrus*) 植物属蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Maloideae),是我国重要的果树之一,长期以来,对我国农业经济的发展起到了重要的作用。全世界梨属植物约有 60 余种,起源于我国的梨属植物为 14 种以上^[1]。

目前,对梨的遗传多样性的研究已有不少报道,例如,李树玲等^[2]对大鸭梨与不同倍性梨品种杂交后代的染色体数目进行了鉴定,发现 30 株三倍体,占 1.9%;68 株四倍体,占 17.8%;余者为二倍体。曲柏宏等^[3]用 POD 同工酶技术研究表明梨属植物有共同的特征酶谱带,秋子梨 (*P. ussuriensis* Maxim)、砂梨 (*P. pyrifolia* Nakai)、白梨 (*P. bretschneideri* Rehd)、西洋梨 (*P. communis* L.) 4 个栽培种间谱带差异较大,种内品种间谱带差异较小,苹果梨在遗传关系上和白梨系统有很大的相似性。BAO 等^[4-5]利用 SSR 引物对东亚地区的 100 个梨的遗传多样性和亲缘关系进行了研究;张东^[6]采用 SSR 和 AFLP 标记对中国红皮砂梨资源的遗传多样性及亲缘关系进行了研究,分别用 6 对 SSR 引物对 29 个砂梨品种和 6 对 AFLP 引物对 38 个砂梨品种进行鉴定。曹玉芬等^[7]利用 SSR 技术对白梨、砂梨、秋子梨、西洋

梨、新疆梨以及种间杂交类型共 41 个栽培品种进行了梨品种鉴别、遗传多样性以及亲缘关系研究。虽然,目前对梨的遗传多样性的研究不少,但大都集中在对栽培品种的研究上,对于野生资源的研究相对较少,缺乏对野生梨属植物资源遗传多样性的了解,因此,很难对野生梨资源做进一步的开发和利用。野生梨资源具有更好的抗性特征,可作为栽培品种的优良砧木,具有非常广阔的应用前景。但是,随着环境的破坏以及商业用地的大量开发,其数量正在逐年减少,因此,研究其遗传多样性,为资源的保护和开发利用奠定基础显得尤为重要^[8]。

研究遗传多样性的方法随着生物学研究层次的提高而不断发展。目前已经从传统的形态标记、染色体标记以及生化标记发展到分子标记。近年来,以 PCR (Polymerase Chain Reaction) 为基础的各种分子标记技术被广泛使用^[9-11],随着该技术的日渐成熟,在梨属植物上运用此技术的研究也越来越多^[12-15]。在多种分子标记技术中,SSR (Simple Sequence Repeat) 分子标记具有多态性好、辨别率高、信息量大、共显性标记、所需 DNA 量少等优点,因此,已被许多研究学者采用。综上所述,SSR 分子标记技术已经成为一种可靠且被广泛使用的分子标记技术。

通过长期的调查研究发现,山西省气候条件和地貌特征独特,使其成为梨野生资源的广泛分布区。为了能更系统的了解山西省局部地区野生梨属植物资源的分布及遗传特点,该研究利用 SSR 分子标记技术对采自山西省的 50 份梨野生资源的遗传多样性进行了分析,期望能为我国梨属植物的育种和新砧木开发提供理论指导。

第一作者简介:曲永青(1987-),女,硕士研究生,研究方向为果树栽培生理与分子生物学。E-mail:nongxueyuan123ko@163.com.

责任作者:马春晖(1966-),男,博士,副教授,研究方向为果树栽培生理。E-mail:machunhui2000@163.com.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2007D64);国家现代农业(梨)产业技术体系建设专项资助项目(Nycytx-29-06)。

收稿日期:2015-05-18

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013 年 4—5 月对山西省局部地区 5 个梨野生资源

居群进行了实地考察,并采集刚展开的叶片装入封口带用硅胶干燥保存带回实验室,液氮处理后-80℃保存备用。

表 1

供试样品

Table 1

The selected samples

序号 No.	名称 Name	采集地 Region	经度 Longitude(E)	纬度 Latitude(N)	海拔 Elevation/m	所属种 Specie
1	TG-1	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'15.4"	112°33'04.31"	794	杜梨
2	TG-2	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°26'13.32"	112°33'06.45"	793	杜梨
3	TG-3	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'35.23"	112°32'05.32"	797	杜梨
4	TG-4	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°35'22.44"	112°33'05.47"	795	杜梨
5	TG-5	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'18.07"	112°33'06.38"	792	杜梨
6	TG-6	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°27'38.06"	112°35'04.31"	795	杜梨
7	TG-7	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'47.48"	112°29'07.53"	794	杜梨
8	TG-8	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'17.45"	112°35'04.58"	790	杜梨
9	TG-9	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°29'18.36"	112°33'36.21"	783	杜梨
10	TG-10	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°37'17.43"	112°32'45.17"	794	杜梨
11	TG-11	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'28.46"	112°37'36.28"	775	杜梨
12	TG-12	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'33.27"	112°35'16.43"	793	杜梨
13	TG-13	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'32.5"	112°36'32.53"	795	杜梨
14	TG-14	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°28'22.47"	112°33'55.34"	784	杜梨
15	TG-15	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°26'31.54"	112°32'48.42"	793	杜梨
16	TG-16	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°31'17.48"	112°33'32.18"	775	杜梨
17	TG-17	山西·太谷县 Taigu, Shanxi	37°25'22.5"	112°28'25.38"	796	杜梨
18	SZG-1	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°58'56.47"	111°10'53.61"	1 339	杜梨
19	SZG-2	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°47'28.39"	111°18'53.27"	1 338	杜梨
20	SZG-3	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°59'79.19"	111°14'49.38"	1 339	杜梨
21	ZTS-1	山西·中条山 Zhongtiao Mountain, Shanxi	34°45'56.99"	110°47'57.83"	1 021	杜梨
22	ZTS-2	山西·中条山 Zhongtiao Mountain, Shanxi	35°16'24.35"	111°30'37.85"	1 186	杜梨
23	BJS-1	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°28'54.06"	111°25'42.18"	1 632	杜梨
24	BJS-2	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°28'54.06"	111°25'33.58"	1 537	杜梨
25	BJS-3	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°28'54.06"	111°27'42.23"	1 635	杜梨
26	BJS-4	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°28'54.06"	111°25'38.11"	1 707	杜梨
27	BJS-5	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°37'34.27"	111°54'36.43"	1 363	杜梨
28	BJS-6	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°45'65.32"	111°26'32.65"	1 345	杜梨
29	BJS-7	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°17'46.56"	111°30'52.67"	1 366	杜梨
30	BJS-8	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°36'38.09"	111°44'25.69"	1 356	杜梨
31	BJS-9	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°30'26.10"	111°31'31.24"	1 453	杜梨
32	BJS-10	山西·白家山 Baijia Mountain, Shanxi	37°45'52.21"	111°25'34.22"	1 489	杜梨
33	JX-1	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°29'22.12"	111°34'00.05"	733	杜梨
34	JX-2	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°43'28.57"	111°45'07.75"	698	杜梨
35	JX-3	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°33'45.22"	111°45'15.80"	745	豆梨
36	JX-4	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°40'25.47"	111°35'12.43"	707	杜梨
37	JX-5	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°47'47.38"	111°56'27.66"	732	杜梨
38	JX-6	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°22'35.78"	111°57'08.22"	678	杜梨
39	JX-7	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°57'56.27"	111°56'17.35"	695	杜梨
40	JX-8	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°37'33.52"	111°30'07.66"	731	杜梨
41	JX-9	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°29'28.42"	111°29'18.37"	732	杜梨
42	JX-10	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°25'47.28"	111°57'37.68"	689	豆梨
43	JX-11	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°45'67.57"	111°26'22.31"	706	杜梨
44	JX-12	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°42'67.88"	111°19'00.10"	749	杜梨
45	JX-13	山西·绛县 Jiang, Shanxi	35°49'52.72"	111°20'32.75"	734	豆梨
46	JKX-1	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°52'31.42"	111°48'53.21"	1 782	杜梨
47	JKX-2	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°48'32.92"	111°32'50.31"	1 772	杜梨
48	JKX-3	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°35'47.55"	111°17'47.38"	1 775	杜梨
49	JKX-4	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°50'33.83"	111°15'21.64"	1 769	杜梨
50	JKX-5	山西·交口县 Jiaokou, Shanxi	36°48'52.51"	111°26'38.42"	1 745	杜梨

1.2 试验方法

1.2.1 DNA的提取 DNA采用TIANGEN生化科技有限公司的TP-305型离心柱式植物DNA提取试剂盒提取。获得的DNA模板调节质量浓度至20 ng/ μ L备用。

表2

引物序列

Table 2

Primer sequences

引物名称 Name of primers	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}$ C
TsuENH155	CGACTCTCCCTCACTTTTGC	GTTTCTTGGAGAAATGGATCTCAAGCG	48
NH029a	GAAGAAAACAGAGCAGGGCA	CCTCCCGTCTCCACCATATTAG	50
BGA35	AGAGGGAGAAAGGCGATT	GTTTCTTGCTTCATCACCGTCTGCT	53
Nb104a	TCGGAGAGGAAGAGTTGGAGGA	AGGTCCGTGCCAGTTTCTTTC	55
CH02e02	CTCATCAGTCTCACTGACTGTGTG	GTTTCTTAGGGTCAGGGTCAGTCAGG	55
CH02b10	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	50
NB105a	AAACAACCGACTGAGCAACATC	AAAATCTTAGCCAAAATCTCC	50
NH009b	CCGAGCACTACCATTTGA	GTTTCTTCGTCTGTTTACCGCTTCT	50
NB141b	GTTTCTTCAGAGAAAGACAGAGGTAGAGAGAA	GGATTGATCGCCTTATGGTTGT	53
CH02d10b	GTAACCTTTGTGCGCGTG	GTTTCTTGCCCTTGAGTTTCTCAGCATTG	53
CH03g06	ATCCACAGCTTCTGTTTTTG	TCACAGAGAATCACAAGGTGGA	50
NH039a	TGGTTGCCGAGAAAGTGTAG	CAAGCAAGTACAACATGAGTGG	53
CH02D11	AGCGTCCAGAGCAACAGC	AACAAAAGCAGATCCGTTGC	52
NH004a	AGGATGGGACGAGTTTAGAG	CCACATCTCTCAACCTACCA	53
NH011b	TGGTTCACATAGAGAGAGAGAGAGA	TTTGCCGTGGACCGAGC	54
NH013a	GGTTTGAAGAGGAATGAGGAG	CATTGACTTTAGGGCAGATTTTC	50
NH015a	TTGTGCCCTTTTCTTACC	CTTTGATGTTACCCCTTGCTG	50
KA4b	AAAGGTCTCTCACTGTCT	CCTCAGCCAACTCAAAGCC	51
CH02c02a	CTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA	TAGGGCACACTTGCTGGTC	52
CH02h11a	CGTGGCATGCCATCATTTG	CTGTTTGAACCGCTTCCTTC	52
CH03c02	TCATAATTACGGGATCAAGCA	GTGCAGAGTCTTTGACAAGGC	51
CH03d12	GCCAGAGCAATAAGTAAACC	ATTGCTCCATGCATAAAGGG	50
CH04h02	GGAAAGCTGCATGATGAGACC	CTCAAGGATTTTCATGCCAC	52
CH05d03	TACCTGAAAGAGGAAGCCCT	TCATTCTTCTCACATCCACT	51
CH01h01	GAAAGACTTGCACTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	53
CH02d08	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	53
CH03d02	AAACTTTCACCTTTCACCCAG	ACTACATTTTATGATTGTGCGTTC	50
CH04e05	AGGCTAACAGAAATGTGGTTTG	ATGGCTCCTATTGCCATCAT	50
CH05e06	ACACGCACAGAGACAGAGACAT	GTTGAATAGCATCCAAAATGGT	51
NB113a	ATGAAATAATGTGCTGTTGCCCTTAG	CCCTTCTCAGCATGTTTCTTAGAC	52
BGT23b	CACATTCAAAGATTAAGAT	ACTCAGCCTTTTTTCCCAC	52
KA16	GCCAGCGAACTCAAATCT	AACGAGAACGACGAGCG	51
KU10	AGTATGTGACCACCCCGATGTT	AGAGTCGGTTGGGAAATGATTG	54
KA14	TCATTGTAGCATTTTATTTTT	ATGGCAAGGGAGATTATTAG	53
CH01f02	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTTGTGTTTCTCCAGC	48
CH01f07a	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC	48
CH01g05	CATCAGTCTCTTGCACTGGAAA	GACAGAGTAAGCTAGGGCTAGGG	50
CH03g12	CAAGGATGCGCATGTATTG	GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT	50
CH04d02	CGTACGCTGCTTCTTTTGCT	CTATCCACCACCGTCAACT	49

1.2.3 PCR扩增 PCR反应体系:采用20 μ L PCR反应体系,其中10 μ L Dream Taq Green PCR Master Mix (2 \times),2 μ L DNA模板(20 ng/ μ L),正反向引物各1 μ L,6 μ L ddH₂O。PCR扩增程序:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性45 s,48~55 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR扩增结束后加入5 μ L溴酚蓝指示剂95 $^{\circ}$ C变性5 min。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 PCR产物采用6%的聚丙烯酰胺凝胶,电泳条件为:恒电压180 V,电流100 mA,预电泳30 min,加入4 μ L PCR产物,电泳1.5 h,1 \times TBE作为电极缓冲液。

1.2.2 SSR引物序列的获得及筛选 SSR引物参考YAMAMOTO等^[16]、HAN等^[17]、许靖诗等^[18]报道的序列,由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。该试验从78对引物中筛选了40对电泳谱带清晰、多态性好的引物对试验材料进行扩增(表2)。

1.2.5 凝胶银染显色 固定银染:电泳结束后将凝胶放入染色液(10%乙醇,1%乙酸,0.2% AgNO₃)中轻摇10 min;显色:将银染后凝胶用双蒸水快速冲洗2遍后,放入显色液(1.5% NaOH,0.5%甲醛)轻摇至条带显色后,用双蒸水漂洗,置于背景灯上拍照记录。

1.3 数据分析

记录每个SSR位点上清晰且重复性好的条带,以1和0分别代表等位基因的有无,采用Power Marker V3.25 OPGENE软件^[19-20]对扩增条带信息进行分析,得出主要等位基因频率、基因遗传多样性、期望杂合度和多态信息含量等参数的数值;利用NTSYS-pc 2.10e^[21]

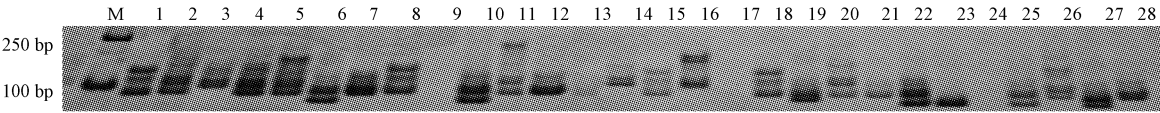
软件计算 SM 相似系数,并采用 UPGMA 法对遗传距离进行聚类分析,得出聚类图谱。

2 结果与分析

2.1 野生梨资源的 SSR 扩增结果

筛选的 40 对 SSR 引物均能扩增出清晰可辨的条带

(图 1)。40 对引物共检测出 236 个等位基因位点,平均每对引物 5.90 个等位位点,其中多态性条带 220 个,多态比率 93.22%(表 3)。结果表明,SSR 分子标记能够揭示野生梨资源较高的多态性,并能较好的反映野生梨资源间的遗传多样性关系。



注:M,Marker;1~28,样本序号。
Note:M,Marker;1-28,sample code number.

图 1 引物 NH004a 的 SSR 扩增结果

Fig. 1 Amplification pattern of the primer pair NH004a

表 3 40 对引物对 50 份野生梨资源的扩增信息

Table 3 The amplification information of 40 SSR primes in 50 wild pear resources

引物 Marker	扩增带数 No. of bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态率 Percentage of polymorphic bands/ %	基因遗传多样性 Gene diversity	期望杂合度 Heterozygosity	多态信息含量 PIC
TsuENH155	6	6	100.00	0.314 5	0.433 3	0.261 1
NH029a	10	7	70.00	0.417 4	0.626 0	0.338 7
BGA35	10	10	100.00	0.405 8	0.612 0	0.330 6
Nb104a	6	6	100.00	0.399 0	0.633 3	0.309 8
CH02e02	6	6	100.00	0.413 2	0.603 3	0.336 8
CH02b10	8	8	100.00	0.358 5	0.527 5	0.297 3
NB105a	8	6	80.00	0.399 3	0.617 5	0.314 1
NH009b	8	8	100.00	0.2900	0.432 5	0.431 2
NB141b	6	6	100.00	0.300 3	0.410 0	0.243 8
CH02d10b	6	6	100.00	0.381 3	0.613 3	0.309 6
CH03g06	8	7	87.50	0.431 9	0.775 0	0.342 0
NH039a	6	5	83.33	0.370 0	0.556 7	0.294 2
CH02D11	4	4	100.00	0.363 9	0.535 0	0.299 9
NH004a	5	5	100.00	0.373 0	0.544 0	0.308 1
NH011b	6	6	100.00	0.361 9	0.493 3	0.304 1
NH013a	4	4	100.00	0.276 2	0.335 0	0.236 8
NH015a	6	6	100.00	0.353 7	0.554 4	0.291 1
KA4b	5	4	80.00	0.390 7	0.572 0	0.311 0
CH02c02a	6	4	66.67	0.402 4	0.603 3	0.318 6
CH02h11a	5	5	100.00	0.390 7	0.540 0	0.313 6
CH03c02	7	7	100.00	0.362 6	0.497 1	0.294 7
CH03d12	7	5	71.43	0.346 0	0.465 0	0.293 5
CH04h02	5	5	100.00	0.322 8	0.456 0	0.263 1
CH05d03	5	5	100.00	0.323 1	0.444 0	0.264 3
CH01h01	5	5	100.00	0.332 1	0.440 0	0.273 9
CH02d08	6	5	83.33	0.334 6	0.443 3	0.275 9
CH03d02	6	6	100.00	0.328 7	0.440 0	0.270 1
CH04e05	6	6	100.00	0.338 7	0.453 3	0.278 3
CH05e06	6	6	100.00	0.383 2	0.534 7	0.307 6
BGT23b	4	3	75.00	0.376 3	0.520 0	0.303 5
BGT23b	5	5	100.00	0.365 0	0.504 0	0.305 2
KA16	5	5	100.00	0.361 5	0.476 0	0.295 8
KU10	6	6	100.00	0.350 6	0.475 7	0.286 2
KA14	5	4	80.00	0.363 2	0.488 0	0.295 7
CH01f02	6	5	83.33	0.398 3	0.553 3	0.318 5
CH01f07a	5	5	100.00	0.368 4	0.504 0	0.298 1
CH01g05	5	5	100.00	0.388 6	0.536 0	0.312 2
CH03g12	4	4	100.00	0.329 3	0.420 0	0.274 3
CH04d02	5	5	100.00	0.361 3	0.475 0	0.305 7
CH05c07	4	4	100.00	0.342 3	0.440 0	0.293 4
Average	5.90	5.50	93.22	0.361 8	0.514 6	0.300 1

不同样品间遗传多样性指数在 0.276 2~0.431 9, 平均值为 0.361 8, 揭示了一个较高的遗传多样性水平; 检测位点杂合度最高值为 0.775 0, 最低值为 0.335 0, 平均杂合度为 0.514 6; 多态信息含量变化范围在 0.236 8~0.431 2, 平均值为 0.300 1。

不同地区之间的梨野生资源的遗传多样性差异明显, 其中基因遗传多样性参数(Gene Diversity)从大到小排序为白家山>交口县>绛县>中条山>太谷县, 表现出了相对较高的遗传多样性; 多态信息含量(PIC)基本分布在 0.300 0 左右, 遗传多态性适中。期望杂合度均超过 0.500 0, 说明 5 个地区的样品的群体多样性均具有统计学意义。

表 4 不同地区野生梨资源遗传多样性参数

Table 4 The genetic diversity parameters of the wild pear resources in different areas

采集地 Region	样品数量 Samples	基因遗传多样性 Diversity	期望杂合度 Heterozygosity	多态信息含量 PIC
太谷县	17	0.379 9	0.510 2	0.307 7
中条山	2	0.382 5	0.589 3	0.305 2
白家山	10	0.391 8	0.535 3	0.315 0
绛县	13	0.388 9	0.529 5	0.313 2
交口县	8	0.391 7	0.534 6	0.315 1

2.2 聚类分析

聚类图谱显示, 50 份材料均能被分开, 相似系数在 0.444 9~0.944 9, 说明在分子水平上各个样品之间的遗传多样性比较丰富。其中 TG-6 与 TG-15 相似系数最大为 0.944 9, 说明 2 个样品之间亲缘关系最近; 而 JX-10 与 JX-11 之间的相似系数最小为 0.444 9, 说明二者的亲缘关系较远。50 份供试材料在相似系数为 0.57 左右被分为四大类群。

其中, 类群 I 属于豆梨, 类群 II、III、IV 属于杜梨。JX-3、JX-10、JX-13 三个供试样品同属于类群 I, 显示了较近的亲缘关系。类群 II 包含 18 份供试样品, 可分为 2 个亚群, 其中 4 份白家山、1 份中条山和 1 份绛县的样品同属于第 1 个亚群, 另外 6 份绛县、5 份交口县的样品同属于第二亚群; 类群 III 包含 12 份供试样品, 其中 3 份舍子沟样品关系密切, 其它样品的谱系关系较为复杂, 但大部分来自白家山和绛县地区。类群 IV 的谱系关系较单一, 样品全部来自太谷县, 其中 TG-6 与 TG-15 的关系最为密切, 相似系数达到了 0.944 9。

整个聚类图中, 类群 IV 中各个样品间的相似系数变化范围在 0.627 1~0.944 9, 比其它类群样品间的相似系数大, 说明太谷县样品间的亲缘关系比较近。类群 II 和类群 III 集中了大部分白家山和绛县地区的样品, 彼此间的亲缘关系较为密切。综上所述, 聚类类群分布与样品来源地基本吻合。

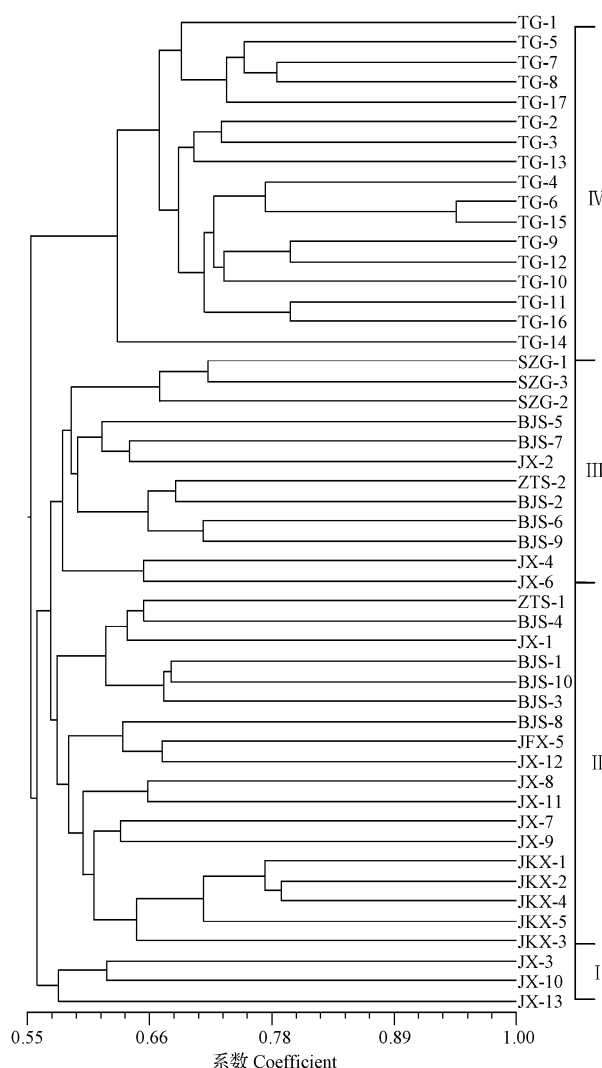


图 2 基于 SSR 数据绘制的梨野生资源的聚类图
Fig. 2 Dendrogram of wild pear resources based on SSR markers

3 讨论

山西省属于我国北方地区, 是梨属植物资源较为丰富的地区之一, 长期以来受到研究者的关注, 但是由于受地理条件的限制, 以及人为砍伐的影响, 资源的分布范围和数量在急剧的减少, 因此, 及时地开展山西梨属植物资源的调查和研究是一项十分重要的工作。为了解山西梨属植物的分布, 对山西梨属植物资源进行了实地考察, 并采集接穗进行了资源保存, 采集叶片, 资源分布主要集中在吕梁山脉、中条山脉以及晋中等地区, 其中以吕梁山脉资源最为丰富。主要分布在海拔 600 m 以上的山区, 植被为落叶灌木林地, 一般分布在半山腰及河谷边沿地带零散分布。类型主要有杜梨、豆梨等类型, 其中以杜梨分布最广。山西梨属植物资源遗传多样性丰富, 利用 SSR 分子标记技术对山西梨属植物进行了比较分析, 从结果来看, 40 对 SSR 引物的扩增结果中各

个参数均具有统计学意义,能够很好地对不同的种类进行区分。这与人对其它地区梨属植物的分析结果基本相一致^[22]。50 份资源的聚类分析指出,基本可以将供试样品按照地理来源加以区分,可以反映物种间亲缘关系和地域遗传差异,对研究植物起源和分布具有一定的意义。但也有少数的样品与实际不相符合,如绛县地区的梨属植物被分到不同的类群,以上说明绛县地区的梨野生资源亲缘关系较为复杂,具体原因有待进一步的研究。

在资源调查中发现大果、绿皮类型资源,果实比普通杜梨大 2~4 倍,果皮为绿色,但新梢枝条的绒毛及叶片形状与杜梨相似,其编号为‘TG-6’和‘TG-15’。该类型在其他省份较为少见,属稀有资源。利用 SSR 引物可以将该类型与其它梨属植物资源区分开,从聚类图谱上显示,TG-6 和 TG-15 聚为一类。以上说明,该大果类型与普通杜梨存在差异,可能属于杜梨的变异类型,有待进一步确认。另外,在对山西梨资源调查中发现,杜梨资源在果实大小、果皮色泽、萼片的宿存、叶片大小、花瓣颜色等方面变异类型多样,但在该分类中难以区分,这些给今后在资源分类研究提出了新的问题,需要针对植物的某一性状选择特殊引物来进行检测分析,这样有利于深入了解不同梨属植物资源的遗传特性,使分子标记技术能够准确、全面的反映出植物的遗传特性。

野生植物的遗传多样性不仅是现代农业可持续发展的物质基础,也是维护生态安全的重要屏障。因此,保护野生植物资源遗传多样性对人类生存和发展具有重要意义^[23]。梨属植物在长期的自然演化过程中形成了对不同环境条件的适应,具有良好的抗御不良环境的能力,是未来植物抗性育种的优良基因库,特别对梨树砧木抗性育种具有重要的开发利用价值。该次山西梨属植物实地调查和遗传多样性分析,基本摸清了山西局部地区梨属植物资源类型,同时发现了一些可能的新的变异类型,为今后的遗传资源的保护和开发利用提供了参考依据。

参考文献

- [1] 李秀根,张绍铃.世界梨产业现状与发展趋势分析[J].烟台果树,2007(1):12-17.
- [2] 李树玲,曹玉芬,黄礼森,等.大鸭梨与不同倍性梨品种杂交后代染色体数目鉴定[J].天津农学院学报,1998,5(4):1-7.
- [3] 曲柏宏,严花淑,陈艳秋,等.同工酶分析在梨品种分类中的应用[J].

延边大学农学报,2003,25(1):86-91.

- [4] BAO L,CHEN K,ZHANG D,et al. An assessment of genetic variability and relationships within Asian pears based on AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers[J]. Sci Hortic,2008,116(4):374-380.
- [5] BAO L,CHEN K,ZHANG D,et al. Genetic diversity and similarity of pear(*Pyrus L.*) cultivars native to east Asia revealed by SSR (Simple Sequence Repeat) markers[J]. Genet Resour Crop Evol,2007,54(5):959-971.
- [6] 张东.中国红皮砂梨遗传多样性及亲缘关系的 SSR 和 AFLP 分析[D].杭州:浙江大学,2006.
- [7] 曹玉芬,刘凤之,高源,等.梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性[J].园艺学报,2007,34(2):305-310.
- [8] 杨军.梨野生资源及杂交 F-1 代的遗传多样性研究[D].南京:南京农业大学,2012.
- [9] 管晓庆,王奎玲,刘庆华,等. RAPD 技术在我国观赏植物中的应用[J].北方园艺,2007(4):75-77.
- [10] 王永清,付燕,杨岑,等.枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析[J].林业科学,2010,46(4):49-57.
- [11] 许云亭,吴文墙,谢俊,等.111 份大暑种质资源遗传多样性 AFLP 分析[J].植物遗传资源学报,2014,15(2):299-304.
- [12] 沈玉英,滕元文,田边贤二.部分中国沙梨和日本梨的 RAPD 分析[J].园艺学报,2006,33(3):621-624.
- [13] 朱立武,王艳芳,贾兵,等.安徽砀山酥梨自然保护区梨种质资源 AFLP 分析[J].果树学报,2009,26(2):145-150.
- [14] 蔡丹英,范太伟,滕元文,等.甘肃中部梨种质资源的 AFLP 分析[J].果树学报,2008,25(3):298-304.
- [15] 路娟,吴俊,张绍铃,等.基于苹果 EST-SSR 的梨种质资源遗传多样性分析[J].西北植物学报,2010,30(4):645-651.
- [16] YAMAMOTO T,KIMURA T,SAITO T,et al. Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map[J]. Acta Hort,2004,663:51-55.
- [17] HAN Y,ZHENG D,VIMOLMANGKANG S,et al. Integration of physical and genetic maps in apple confirms whole-genome and segmental duplications in the apple genome[J]. Exp Bot,2011,62(14):5117-5130.
- [18] 许靖诗,乌云塔娜,叶生品,等.梨种质资源 SSR 引物的筛选与评价[J].中南林业科技大学学报,2012,32(7):80-85.
- [19] LIU K,MUSE S V. Power marker:an integrated analysis environment for genetic marker data[J]. Bioinformatics (Oxford England),2005,21(9):2121-2129.
- [20] PEAKALL R,SMOUSE P E. GENALEX 6:genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Mol Ecol Notes,2006,6(1):288-295.
- [21] TAKEZAK I N,NEI M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA[J]. Genetics,1996,144(1):389-399.
- [22] 宗宇,孙萍,牛庆丰,等.中国北方野生杜梨分布现状及其形态多样性评价[J].果树学报,2013,30(6):918-923.
- [23] 杨庆文,秦文斌,张万霞,等.中国农业野生植物原生境保护实践与未来研究方向[J].植物遗传资源学报,2013,14(1):1-7.

Genetic Diversity Analysis of Pear Genus in Shanxi Province by SSR Marker

QU Yongqing,WANG Ran,MA Chunhui,LI Dingli,SONG Jiankun

(College of Horticulture,Qingdao Agricultural University,Qingdao,Shandong 266109)

SH40 中间砧苹果苗木休眠期假植 失水原因分析及防护措施

张 丹, 张 鹤, 邵建柱, 孙建设

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071000)

摘 要: SH40 是目前我国华北地区主要应用的苹果矮化砧木。生产中冬季假植的 SH40 中间砧苹果苗木春季土壤解冻后往往出现中间砧段率先失水褶皱、随后整株失水现象, 对生产极为不利。该研究以一年生冬季休眠期红富士/SH40/八棱海棠为试材, 探究 SH40 中间砧苹果苗木休眠期假植中间砧段率先失水原因。结果表明: SH40 中间砧苗木休眠期假植中间砧段率先失水与中间砧自身的品种特性关系不大; 根系蒸腾是导致中间砧段率先失水褶皱的主要原因, 当根系缺水, 蒸腾量较大时, 导管内部形成水势差, 迫使中间砧水分逆向运移至根部。根系越庞大, 中间砧段失水速率越快, 失水褶皱情况越严重。失水率达 20% 是中间砧及接穗能够复水成活的阈值, 超出阈值苗木即不能成活。

关键词: SH40 中间砧; 苹果苗木; 休眠假植; 失水

中图分类号: S 661.105⁺.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2015)16-0017-05

矮化密植栽培是当今世界果树栽培发展趋势^[1], 而矮化砧木的利用仍是目前实现矮化密植栽培的重要手段^[2]。SH 系苹果矮化砧木因其易成花, 早果, 果实品质优良, 抗寒, 抗干旱, 抗抽条及适应范围广等优势在山西、河北、甘肃、陕西地区广泛使用^[3-6]。其中, SH40 是

目前我国华北地区主要应用的苹果矮化砧木^[7]。

研究表明 SH 系中间砧抗寒性及抗旱性优于 M7、M9^[8]、M26、GG80、JM7^[9] 中间砧, 越冬能力强。但生产中发现冬季休眠期假植的 SH40 中间砧苹果苗木春季土壤解冻后往往出现中间砧段率先开始失水褶皱, 随后整株失水现象, 轻则树势减弱, 重则树体死亡, 这给生产带来极为不利的影响。然而, 与之相关的研究却鲜见报道, 导致生产中缺乏理论指导, 防护措施显得极为盲目。

因此, 该研究以冬季休眠期 SH40 中间砧苹果苗木为试验材料, 探究 SH40 中间砧苗木休眠期假植失水原因, 旨在为生产中有效的防护措施提供参考依据。

第一作者简介: 张丹(1989-), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向为果树栽培生理与生态。E-mail: zhangdan9884@yeah.net.

责任作者: 孙建设(1957-), 男, 河北保定人, 博士, 教授, 研究方向为果树栽培生理及种质创新。E-mail: jiansheapple@163.com.

基金项目: 国家苹果产业技术体系资助项目(CARS-28)。

收稿日期: 2015-05-25

Abstract: To explore the genetic diversity of wild pear genus in Shanxi Province, the genetic diversity of 50 wild simples of *Pyrus* were analyzed using SSR molecular marker technique in this study, the genetic diversity of 50 wild pear genus were analyzed by SSR molecular marker technique. The results showed that, 236 alleles were amplified by 40 pairs of SSR primers and 5.90 alleles were amplified by per primers. The genetic diversity analysis showed that the genetic diversity indexes varied from 0.276 2 to 0.431 9, the expected heterozygosity were 0.335 0 to 0.775 0, and the polymorphism information content ranged from 0.236 8 to 0.431 2. The diversity of the 50 wild pear resources were showed high by the four parameters. The clustering analysis results showed that the similarity coefficient of the 50 cultivars ranged from 0.444 9 to 0.839 0, all the cultivars were divided into four groups at the similarity coefficient of 0.57, the cultivars of group I belonged to *Pyrus calleryana*, the cultivars of group II, III and IV belonged to *Pyrus betulaefolia*. The most cultivars of Baijia mountain and Jiang county belonged to the group II and group III, however, all the cultivars of Taigu county belonged to group IV, which accorded with the geographic distribution; we also found new *Pyrus betulaefolia* with big fruit and green skin.

Keywords: pear; wild resource; SSR; genetic diversity